

インスリン産生腺 細胞再生遺伝子 Reg のポリ ADP リボース合成酵素による発現調節機構の解明

著者	秋山 貴子
号	1696
発行年	2001
URL	http://hdl.handle.net/10097/22082

氏 名（本籍）あきやまたかこ
秋 山 貴 子

学 位 の 種 類博士（医学）

学 位 記 番 号医博第19号

学位授与年月日平成13年3月26日

学位授与の条件学位規則第4条第1項該当

研 究 科 専 攻東北大学大学院医学系研究科
（博士課程）医科学専攻

学 位 論 文 題 目Activation of *Reg* gene, a gene for insulin-producing β -cell regeneration : Poly (ADP-ribose) polymerase binds *Reg* promoter and regulates the transcription by autopoly (ADP-ribosyl) ation.
（インスリン産生膵 β 細胞再生遺伝子 *Reg* のポリ ADP リボース合成酵素による発現調節機構の解明

（主 査）

論 文 審 査 委 員教授岡本宏教授田村眞理

教授 野 田 哲 生

論文内容要旨

研究目的

インスリン産生 β 細胞は、再生増殖能に乏しく傷害を受けると容易に細胞数が減少し、これが糖尿病発症の背景となっている。インスリン産生細胞増殖因子 *Reg* は糖尿病モデル動物である 90% 膵切除ラットにポリ ADP リボース合成酵素阻害物質を投与することではじめて誘導される再生 β 細胞で、特異的に発現している遺伝子として単離された。*Reg* 受容体は正常、再生膵ランゲルハンス島どちらにも発現量に差はなく、*Reg* 遺伝子が再生増殖時に発現誘導されることがインスリン産生細胞の再生誘導において重要と考えられる。しかしながら、その発現誘導機構は不明であった。本研究の目的は、*Reg* 遺伝子のインスリン産生細胞再生増殖時における発現誘導機構を明らかにすることである。

研究方法

1) ラットインスリンノーマ由来の RINm5F 細胞に炎症性メディエーターである interleukin-6 (IL-6), dexamethasone やニコチン酸アミドなどのポリ ADP リボース合成酵素阻害剤を添加し、RT-PCR 法により *Reg* 遺伝子の発現誘導を検討した。2) *Reg* 遺伝子上流域を導入したルシフェラーゼベクターを用いてレポータージーンアッセイを行った。3) Electro mobility shift assay (EMSA) を行い、*cis*-element 結合複合体を同定した。4) Southwestern blot を行い *cis*-element の結合蛋白質を同定した。5) activity blot 法を用いてポリ ADP リボース合成酵素を自己ポリ ADP リボシル化し、*cis*-element 結合能への影響を検討した。

研究結果

Reg 遺伝子の発現誘導は RINm5F 細胞において IL-6 と dexamethasone の添加により認められ、ポリ ADP リボース合成酵素阻害剤はその発現誘導をさらに増強した。*Reg* 遺伝子の転写誘導に必須の *cis*-element は、-81~-70 (TGCCCCCTCCCAT) の GC box 類似の配列であった。*cis*-element に結合する複合体を EMSA により同定した。その複合体にはポリ ADP リボース合成酵素が存在していた。この複合体形成はポリ ADP リボース合成酵素自身のポリ ADP リボシル化により阻止された。また、Southwestern 法により *cis*-element にポリ ADP リボース合成酵素が結合することを確認した。

結 論

Reg 遺伝子の膵ランゲルハンス島における発現誘導機構は、IL-6 や dexamethasone などの炎症性メディエーターが *Reg* 遺伝子の -81~-70 (TGCCCCCTCCCAT) の GC box 類似の配列にポリ ADP リボース合成酵素が結合し、転写複合体を形成することで転写が誘導され、発現を誘導すると考えられた。ニコチン酸アミドなどのポリ ADP リボース合成酵素阻害剤はポリ ADP リボース合成酵素の自己ポリ ADP リボシル化を阻害することで転写複合体を安定させ、転写誘導を増強すると考えられた。

研究の意義・独創的な点

本研究の意義は、インスリン産生細胞の再生・増殖機構において重要である *Reg* 遺伝子の誘導機構をはじめて明らかにした点である。また、細胞の DNA 修復や apoptosis, 転写調節など多岐の現象に関与していると考えられるポリ ADP リボース合成酵素が *Reg* 遺伝子上流域に結合する転写因子として同定し、そのインスリン産生細胞の再生増殖における役割についてはじめて明らかにした極めて独創的な研究である。さらに、新しく同定した *cis*-element は種々の遺伝子上流に存在することから、ポリ ADP リボース合成酵素が種々の遺伝子の発現調節に関わっていることを示唆し、遺伝子発現調節に新しい展開をもたらす画期的な研究である。

審 査 結 果 の 要 旨

Reg (Regenerating gene) 蛋白はインスリン産生細胞が傷害された際に発現誘導されるインスリン産生膵 β 細胞の再生増殖因子であり、*Reg* 遺伝子が再生増殖時に発現誘導されることがインスリン産生細胞の再生誘導の鍵であると考えられる。

本研究では、*Reg* 遺伝子がインスリン産生細胞で炎症時に増加するインターロイキン 6 (IL-6) とグルココルチコイドにより転写誘導され、この際ポリ ADP リボース合成酵素 (PARP) が *Reg* 遺伝子発現の転写因子として機能することを明らかにした。

ラットインスリン産生細胞である RINm5F 細胞に IL-6 と合成グルココルチコイドである dexamethasone を添加すると *Reg* 遺伝子の発現誘導が認められ、PARP 阻害物質はその発現誘導をさらに増強した。レポーター遺伝子アッセイにより *Reg* 遺伝子の転写誘導に必須の *cis*-element を同定したところ、-81~-70 (TGCCCCTCCCAT) の GC box 類似の配列であった。Southwestern 法により *cis*-element に結合する因子を同定したところ PARP が *cis*-element に結合することを確認した。*cis*-element に結合する複合体をゲル移動度シフト法により解析したところ、転写複合体には PARP が存在していた。この PARP が自己ポリ ADP リボシル化されると複合体形成が消失し、*Reg* 遺伝子の転写は阻止された。

以上のことから、*Reg* 遺伝子の膵ランゲルハンス島における発現誘導機構は、IL-6 やグルコルチコイドなどの炎症性メディエーターの刺激により *Reg* 遺伝子の -81~-70 の GC box 類似配列 (TGCCCCTCCCAT) に PARP が結合し、転写複合体を形成し、*Reg* 遺伝子の発現を誘導すると考えられた。ニコチン酸アミドなどの PARP 阻害剤は PARP の自己ポリ ADP リボシル化を阻害することで転写複合体を安定させ、転写誘導を増強すると考えられた。

本研究では、インスリン産生細胞の再生・増殖の鍵である *Reg* 遺伝子の誘導機構をはじめて明らかにしただけでなく、DNA 修復、がん化、発生、分化など多彩な生命現象への関与が報告されてきた PARP の転写因子としての役割についてはじめて明らかにした極めて独創的な研究である。さらに、新しく同定した *cis*-element は種々の遺伝子の上流に存在することから、PARP が *Reg* 遺伝子以外にも種々の遺伝子の発現調節に関わっていることを示唆し、遺伝子発現調節に新しい展開をもたらす画期的な研究であり、生命科学上の意義が極めて大きい。